

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Testování účinnosti potencionálních léčiv Alzheimerovy choroby

Vedoucí diplomové práce: Doc. MUDr. Josef Herink, DrSc.

Konzultant: PharmDr. Vendula Šepsová

HRADEC KRÁLOVÉ, 2014

Adéla DOLEJŠOVÁ

„Prohlašuji, že tato diplomová práce na téma testování účinnosti potencionálních léčiv Alzheimerovy choroby je mým původním autorským dílem pod vedením pana Doc. MUDr. Josefa Herinka, DrSc. a konzultantky PharmDr. Venduly Šepsové. Veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji.

datum

podpis

ABSTRAKT

Adéla Dolejšová

Testování účinnosti potencionálních léčiv Alzheimerovy choroby

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

Cílem této práce bylo zjistit, zda již zavedená Ellmanova metoda, která je využívána pro stanovení irreverzibilních inhibitorů AChE, bude vhodnou metodou pro měření inhibitorů reverzibilních. Dále byla stanovena účinnost nově nasyntetizovaných inhibitorů AChE, které by mohly být v budoucnu použity na léčbu AD či jako profylaxe před nervově paralytickými látkami. Navíc bylo porovnáváno ovlivnění účinnosti inhibitorů AChE po intramuskulárním a intraperitoneálním způsobem podání.

Testování probíhalo in vivo na potkanech kmene Wistar. V prvním pokusu byly aplikovány standardní inhibitory AChE (takrin, 7-MEOTA, donepezil, rivastigmin) k ověření metody. Ve druhém pokusu byly podávány nově nasyntetizované inhibitory AChE (K 298, K 344, K 474).

Výsledky potvrdily účinnost testované metody na standardně používaných inhibitech jako je donepezil a rivastigmin. Z nově nasyntetizovaných inhibitorů K 298, K 344 a K 474 neprokázal žádný z nich výraznou inhibiční aktivitu.

Klíčová slova: acetylcholinesterasa, inhibitory acetylcholinesterasy, Alzheimerova choroba, cholinergní systém, Ellmanova metoda

ABSTRACT

Adéla Dolejšová

Testing the efficacy of potential therapeutics for Alzheimer,s disease

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Pharmacy

The aim of this thesis was to find out whether already implemented Ellman's method, which is used to analyse irreversible inhibitors AChE, is going to be a suitable technique for measuring reversible inhibitors. Furthermore, the efficiency of newly synthesized AChE inhibitors was established. These inhibitors will be used for treating AD or as prophylaxis against neural paralytic substances. Moreover, it was compared affect the efficacy of AChE inhibitors after intramuscular and intraperitoneal administration.

The measurements were done in vivo on potkan species Wistar. In the first experiment standard AChE (tacrin, 7-MEOTA, donepezil, rivastigmin) inhibitors were applied to verify the method. In the second experiment the newly synthesizes AChE (K 298, K 344, K 474) inhibitors were medicine.

The results confirmed the effectiveness of the tested method on commonly used inhibitors such as donepezil and rivastigmin. Out of the newly synthesized K 298, K 344 and K 474 inhibitors none was proven to have any significant inhibiting activity.

Key words: acetylcholinesterase, acetylcholinesterase inhibitors, Alzheimer disease, cholinergic system, Ellman method

1. Obsah

2. Úvod a zadání práce.....	6
3. Alzheimerova choroba	8
3.1 Úvod.....	8
3.2 Historie.....	8
3.3 Epidemiologie a rizikové faktory.....	9
3.4 Obecná charakteristika	11
3.4.1 Makroskopické změny.....	11
3.4.2 Mikroskopické změny.....	12
3.4.3 Genetické predispozice	14
3.4.4 Metabolické změny	15
3.5 Průběh AD	18
3.6 Diagnostika	18
3.7 Terapie.....	20
4. Cíl	22
5. Metodika	23
5.1 Zvířata.....	23
5.2 Příprava základních roztoků.....	23
5.3 Princip metody	24
5.4 Postup stanovení aktivity inhibitorů AChE.....	27
5.5 Uspořádání pokusů	28
5.6 Zpracování výsledků	28
6. Výsledky	29
7. Diskuze	38
8. Závěr	42
9. Přehled zkratk.....	43
10. Seznam tabulek.....	44

11. Seznam grafů	44
12. Seznam obrázků	45
13. Seznam literatury	46

2. Úvod a zadání práce

Acetylcholin (ACh) je neuromediátor podílející se na přenosu vzruchů v centrálním i periferním nervovém systému. Je tvořen z cholinu a acetylkoenzymu A v presynaptické části neuronu. Působí na muskarinové a nikotinové receptory. Po vyplavení do synaptické štěrbiny je degradován enzymem acetylcholinesterasou (AChE).

AChE rozkládá ACh na nervosvalových ploténkách a v centrální nervové soustavě. Tato reakce je založena na hydrolýze ACh, která tak ukončuje synaptický přenos vzruchu. ACh se rozpadá, cholin se vrací zpět do presynaptické části, kde je z něj opět syntetizován ACh pomocí cholinacetyltransferasy a acetát, který je dále metabolizován.

Inhibitory AChE dělíme do dvou skupin na reverzibilní a ireverzibilní. Mezi nejnebezpečnější ireverzibilní inhibitory patří organofosfáty, známé také jako bojové plyny. Způsobují nahromadění ACh projevující se nadměrným pocením, sliněním, nervozitou, dušností, bradykardií, křečemi, ochrnutím svalstva až smrtí. Další ireverzibilní inhibitory se používají jako insekticidy k hubení hmyzu. Reverzibilní inhibitory se hojně využívají v medicíně, například v terapii myasthenia gravis, k léčbě různých typů demencí včetně AD a jako profylaktikum před NPL.

Při Alzheimerově chorobě dochází k poškození syntézy acetylcholinu, čímž se snižuje jeho množství v synaptických spojkách. To způsobuje nedostatečnou tvorbu vzruchu vedoucího především do CNS. Celkový deficit ACh se projevuje poruchou kognitivních funkcí. Jako léky první volby jsou používány reverzibilní inhibitory AChE, které zvyšují hladinu ACh v synapsích.

Zadání práce

TESTOVÁNÍ ÚČINNOSTI POTENCIONÁLNÍCH LÉČIV ALZHEIMEROVY CHOROBY

1. Cíl práce
2. Úvod: Alzheimerova choroba
 - Historie, epidemiologie, obecná charakteristika
 - Faktory ovlivňující vznik a průběh onemocnění
 - Diagnostika
 - Terapie
3. Metoda
4. Výsledky
5. Diskuse
6. Závěr
7. Literatura

3. Alzheimerova choroba

3.1 Úvod

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegenerativní onemocnění a zároveň nejčastější typ demence, vyskytující se ve vyšším věku. Typickým projevem této nemoci je ztráta kognitivních funkcí, nejvýznamnější porucha se týká paměti, dále to je pozornost, koncentrace, rychlost zpracování informací, řeč a prostorová orientace. Vzhledem k tomu, že věková hranice dožití stále stoupá, přibývá i procento lidí postižených touto nemocí, a tak představuje AD čtvrtou až pátou nejčastější příčinu smrti.¹

3.2 Historie

Poprvé byla AD zmíněna roku 1906, kdy o ní referoval německý psychiatr a neuropatolog Alois Alzheimer na schůzi psychiatrů v Tübingenu. Publikace vyšla o rok později a stala se základním kamenem pojmu AD. Další významnou událostí ve vývoji AD byl rok 1910, kdy Kraepelin, Bonfiglio a Perusiny ze svých studií oddělili pojem AD od „běžné“ senilní demence. Ve vývoji od roku 1928 – 1976 došlo ke sjednocení presenilní AD a senilní demence Alzheimerova typu, jelikož bylo objeveno, že mezi nimi nejsou kvalitativní histologické rozdíly. Sjednocení těchto pojmů bylo potvrzeno v Katzmanově práci roku 1976.²

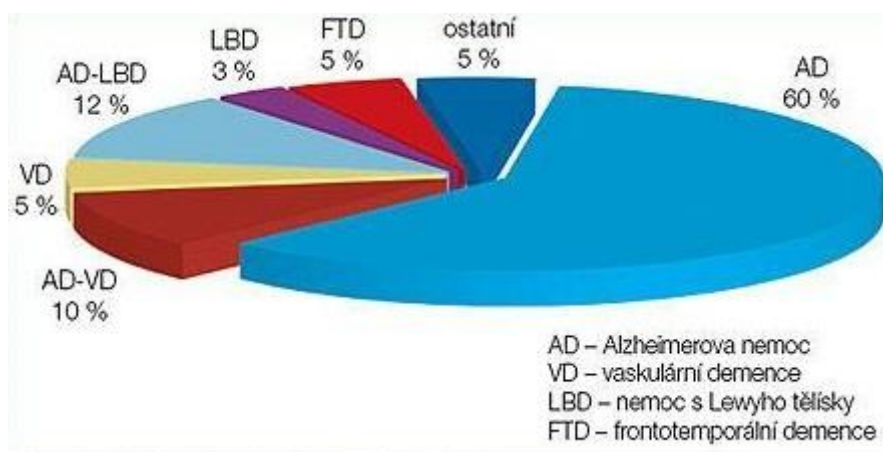
¹ PREISS, Marek et al. *Klinická neuropsychologie*. Praha 7: Grada Publishing, spol, s.r.o., 1998. ISBN 80-7169-443-6.

² KOUKOLÍK, František a Roman JIRÁK. *Alzheimerova nemoc a další demence*. Praha 7: Grada Publishing, spol, s.r.o., 1998. ISBN 80-7169-615-3.

3.3 Epidemiologie a rizikové faktory

AD patří mezi nejčastější typ demence (graf č. 1) a její incidence stále stoupá.

Graf č. 1: Přibližný výskyt jednotlivých typů demence



Zdroj: <http://img.mf.cz/557/673/vyskytu.jpg>

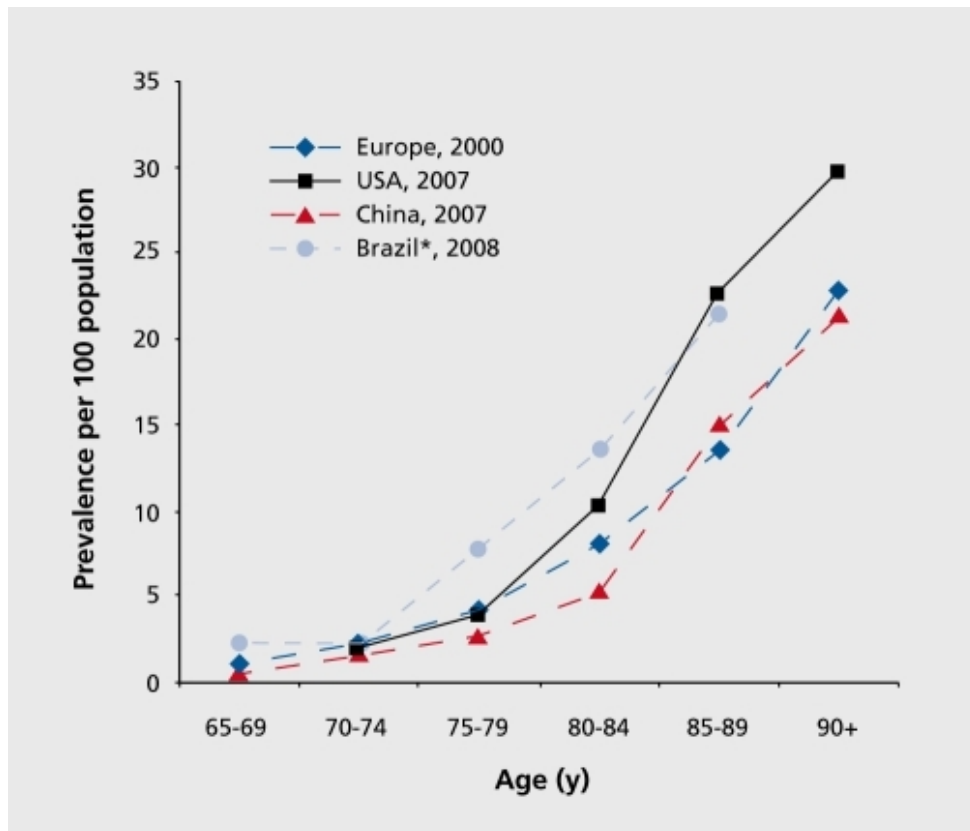
Věk a pohlaví patří mezi základní rizikové faktory pro vznik AD. V tomto případě je mnohem více ohroženo ženské pohlaví než mužské. Kritický věk pro vznik AD je 65 let a více (graf č. 2). Existují však i případy s mnohem dřívějším nástupem tohoto onemocnění, většinou mezi 40 – 50 lety, někdy i dříve. Průběh onemocnění je typický spíše lineárním, postupně rostoucím rozvojem symptomů.³

Dalším významným faktorem je rodinná anamnéza. Výzkumy potvrdily, že ti, kteří mají v rodině, ať už to jsou rodiče, sourozenci či dítě AD, mají mnohem větší pravděpodobnost vzniku tohoto onemocnění. Riziko výrazně stoupá, pokud je v rodině více než jeden jedinec s AD. Hlavní roli v těchto případech hraje genetika a vliv životního prostředí.⁴

³ PREISS, Marek et al. *Klinická neuropsychologie*. Praha 7: Grada Publishing, spol. s.r.o., 1998. ISBN 80-7169-443-6. s. 141.

⁴ *Alz.org: Alzheimer's association* [online]. 2014 [cit. 2014-03-22]. Dostupné z: http://www.alz.org/research/science/alzheimers_disease_causes.asp

Graf č. 2: Závislost výskytu AD na věku



Zdroj: <http://www.intechopen.com/source/html/43129/media/image2.jpeg>

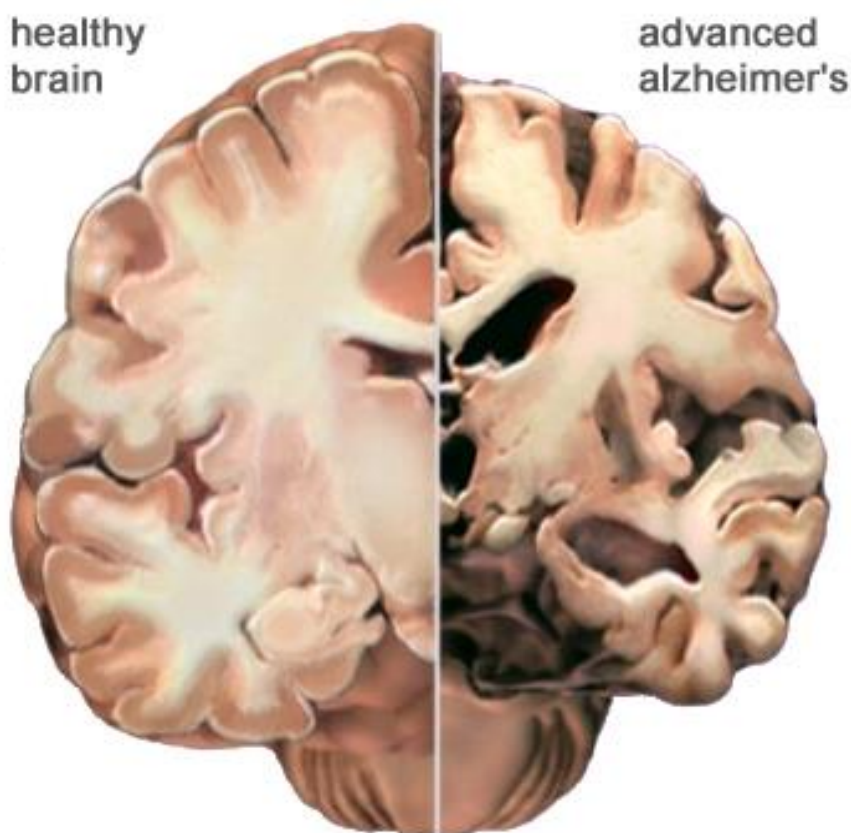
Podle statistických dat Alzheimer's Disease Facts and Figures 2013 je v USA nyní 5,2 milionů obyvatel nad 65 let postižených AD. V roce 2025 je odhad nemocných vyšší o 40 procent a činí 7,1 milionů. Do roku 2050 by toto číslo mohlo narůst až na 13,8 milionů lidí, což by znamenalo třikrát vyšší incidenci než dosud. Mortalita zde stoupla od roku 2000 – 2010 o 68%, tím se AD zařadila na šestou nejčastější příčinu smrti.⁵

⁵ ALZHEIMER'S DISEASE FACTS AND FIGURES. *Alz.org: alzheimer's association* [online]. 2013 [cit. 2014-02-22]. Dostupné z: https://www.alz.org/alzheimers_disease_facts_and_figures.asp

3.4 Obecná charakteristika

3.4.1 Makroskopické změny

AD patří mezi tzv. atroficko-degenerativní demence. Jak už název napovídá, jedná se o chorobu projevující se atrofií neboli zmenšením mozku. U této choroby je typická spíše kortiko-subkortikální atrofie. V několika případech nemusí atrofie odpovídat projevujícímu se stupni demence. Nejčastěji dochází k zužování gyrů, rozšiřování rýh a komor (obr. č. 1). Nejvíce jsou změny viditelné na temporální oblasti.⁶



Obr. č. 1: Porovnání zdravého a postiženého mozku s AD

Zdroj:

http://data.gate2biotech.com/editor_images/Image/Eva/Alzheimer_brain_-_comparison.jpg

⁶ JIRÁK, Roman et al. *Demence*. Praha 4: Maxdorf s.r.o., 1999. ISBN 80-85800-44-6. s. 110

3.4.2 Mikroskopické změny

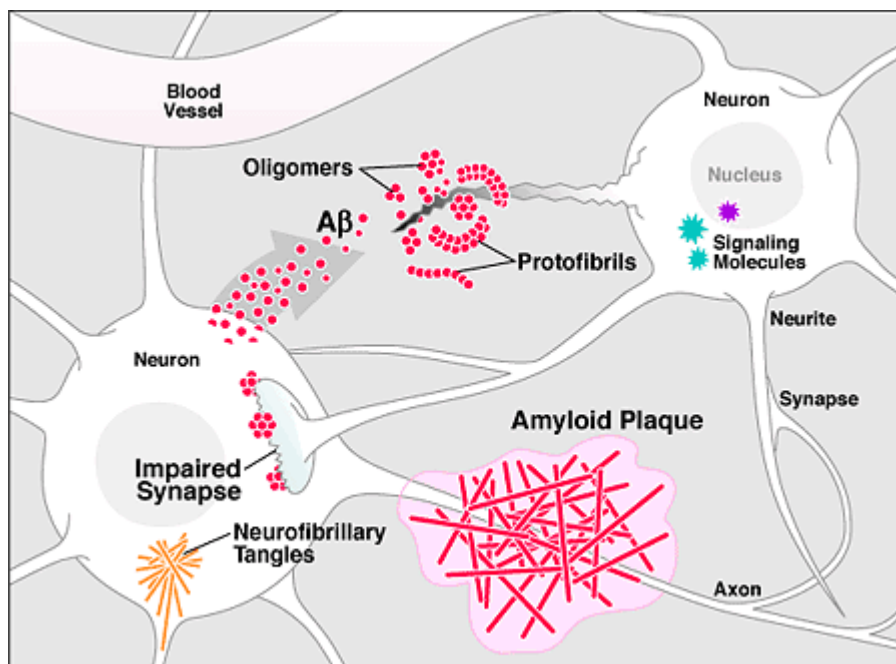
Z mikroskopických změn jsou nejnápadnější ty, jejichž podstatou je ukládání patologických proteinů.⁷

1. **β -amyloid** – tento protein vzniká z amyloidového prekurzorového proteinu (APP), který je za normálních podmínek přirozenou součástí neuronů. V průběhu AD dochází k nadměrnému štěpení APP kvůli mutaci na 21., 14. a 1. chromozomu. Částice APP jsou solubilní (rozpustné), při nadměrné tvorbě však dochází ke koagulaci a tvorbě β -amyloidu. β -amyloid utváří drúzy, které se stávají základem pro tzv. Alzheimerovské plaky ničící nervový systém (obr. č. 2).⁸ Podle pitevních údajů dochází k tvorbě amyloidních plaků mnoho let před projevem prvních symptomů AD. Považují se za iniciátory patologické kaskády událostí vedoucí k neuronální smrti s následným poškozením mozku projevující se tvorbou tau proteinu, oxidativním stresem a přerušáním synaptického přenosu. Největší poškození se nachází na temporálním laloku, který je klíčový pro krátkodobou paměť. Tím se vysvětlují charakteristické výpadky paměti u nemocných především v počátečních stádiích onemocnění.⁹

⁷ PREISS, Marek et al. *Klinická neuropsychologie*. Praha 7: Grada Publishing, spol, s.r.o., 1998. ISBN 80-7169-443-6. s. 139.

⁸ PREISS, Marek et al. *Klinická neuropsychologie*. Praha 7: Grada Publishing, spol, s.r.o., 1998. ISBN 80-7169-443-6. s. 140

⁹ MUSIEK, E.S. a S.E. SCHINDLER. Alzheimer disease: current concepts & future directions. *Missouri Medicine*. 2013, č. 110, s. 395-400.



Obr. č. 2: Vznik amyloidních plaků a neurofibrilárních klubek

Vysvětlivky: amyloid plaque – amyloidní plak, neurofibrillary tangles – neurofibrilární klubka, impaired synapse – narušená synapse, A β – β amyloid, oligomers – vznik oligomerů z A β

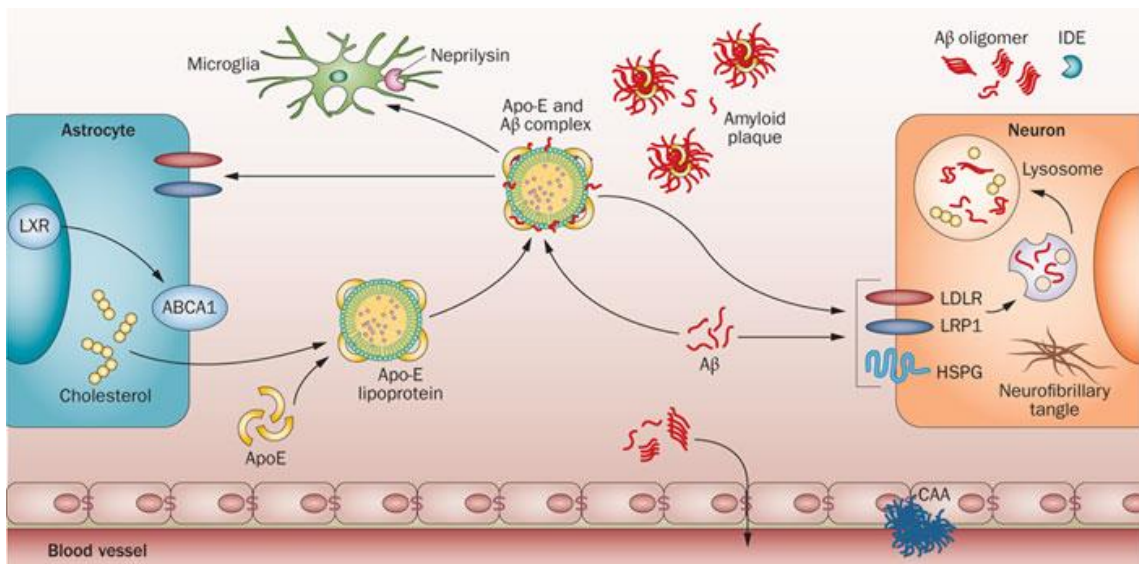
Zdroj: http://data.gate2biotech.com/editor_images/08_cl1_amyloid_beta.gif

2. **Tau protein** – za normálních okolností je součástí mikrotubulů v neuronu. Při AD dochází k jeho agregaci a tvorbě malých shluků, tzv. oligomerů (obr. č. 2 – oligomers) uvnitř nervových buněk. Tento proces agregace stále pokračuje, dochází k replikaci a tvorbě uzlíčků (tangles; obr. č. 2), které byly poprvé objeveny Alzheimerem. Tyto uzlíčky se v neuronech rozšiřují, a tím dochází k jejich zániku. Nedávné studie ukazují, že už ranná stádia oligomerů ničí synapse, jelikož se tvoří v nervových zakončeních, kde za běžných okolností dochází k přenosu neurotransmiteru. Tím je poškozena signalizace z jedné nervové buňky na druhou, která se projevuje ztrátou vyšších mentálních funkcí, počínaje pamětí.¹⁰

¹⁰ HOLMES, C., D. BOCHE, D. WILKINSON, G. YADEGARFAR, V. HOPKINS, A. BAYER, R. JONES, R. BULLOCK, S. LOVE, J. NEAL, E. ZOTOVA a J. NICOLL. Long-term effects of A β 42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet*. 2008, č. 372, 216–223.

3.4.3 Genetické predispozice

1. **Gen pro apolipoprotein E (APOE)** - v lidském organismu je zodpovědný za tvorbu bílkovin apolipoprotein E, který je hlavní složkou molekul VLDL (very low density lipoproteins), jejichž funkcí je snižování cholesterolu v krvi. APOE se vyskytuje nejméně ve třech různých isoformách (alelách). Mezi nejhlavnější patří e2, v populaci nejběžnější e3 a e4. Na vývoj AD má největší dopad e4.¹¹ Tuto alelu má ve své genetické informaci zakódovanou zhruba polovina pacientů s AD, dvě její kopie zvyšují riziko vzniku AD dvanáctkrát. Nedávné studie ukazují, že se ApoE podílí na metabolismu β -amyloidu a utváření amyloidních plaků (obr. č. 3)¹²



Obr. č. 3: Tvorba komplexu Apo-E a β -amyloidu za vzniku amyloidních plaků

Vysvětlivky: LXR – jaterní X receptor regulující cholesterol, ABCA1 – transportér zprostředkovávající eflux cholesterolu, ApoE - apolipoprotein E, LDLR a LRP1 – receptory pro Apo-E, HSPG – heparan sulfát spouštějící agregaci fibril s následným vznikem tau proteinu, CAA – cerebrální amyloidní angiopatie způsobená ukládáním β -amyloidu na stěnách cév CNS

Zdroj:

www.nature.com/nrneurol/journal/v9/n2/fig_tab/nrneurol.2012.263_F2.html

¹¹ Genetic's home reference: Your guide to understanding genetic conditions [online]. 2008, 2014 [cit. 2014-03-03]. Dostupné z: <http://www.ghr.nlm.nih.gov/gene/APOE>

¹² MUSIEK, E.S. a S.E. SCHINDLER. Alzheimer disease: current concepts & future directions. *Missouri Medicine*. 2013, č. 110, s. 395-400.

2. **Gen pro presenilin 1 (PSEN1)** – tento gen tvoří protein presenilin 1, který je součástí komplexu zvaného γ -sekretáza. PSEN1 vykonává hlavní funkci tohoto komplexu, tzv. proteolýzu (štěpení bílkovin na menší části). γ -sekretáza se nachází na membránách buněk, kde dochází k transmembránovému přenosu z vně buňky do jádra. Jedním ze substrátů, u kterého dochází k proteolýze je APP a posléze i solubilní β -amyloid. U AD dochází k více než 150 mutacím PSEN1, což poškozuje zpracování APP, následně dochází k toxickému hromadění β -amyloidu a utváření amyloidních plaků. Pacienti s těmito genetickými predispozicemi trpí časnou formou AD, která se projevuje prvními symptomy před 65 rokem života.¹³
3. **Gen pro presenilin 2 (PSEN2)** – nese informaci pro tvorbu proteinu presenilin 2, který se účastní, stejně jako PSEN1, přenosu informace z buněčné membrány do jádra a zajišťuje růst a zrání buněk. Výzkumy ukazují, že PSEN2 se podílí s jinými enzymy na štěpení APP. Jeho mutací tedy dochází také k hromadění APP a vzniku nerozpustného β -amyloidu. V současné době bylo prokázáno nejméně 11 změn PSEN2 způsobující časný typ AD.¹⁴

3.4.4 Metabolické změny

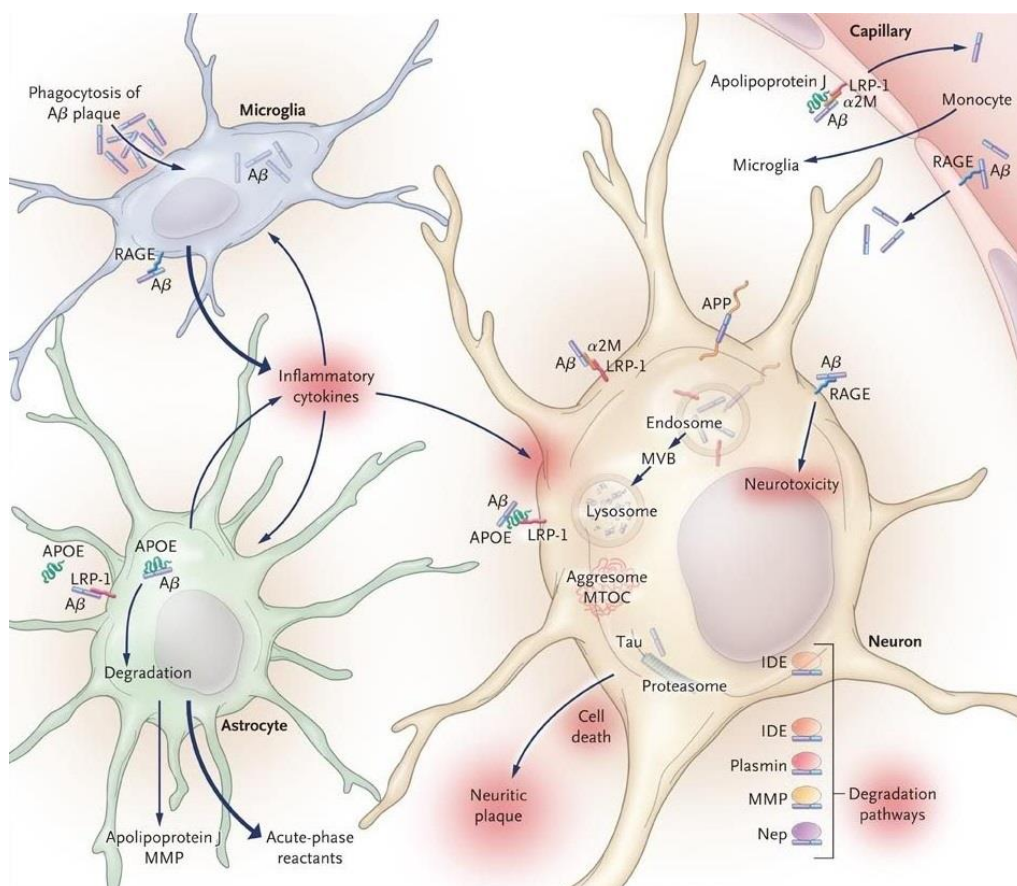
1. **Tvorba volných kyslíkových radikálů (ROS)** – jsou to vysoce aktivní látky, které vznikají v mozku v důsledku jeho patologických změn. Mezi nejčastější zdroje ROS patří mitochondrie, β -amyloid, enzym NADPH (redukováná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu) a glykoxidace, kterou vzniká velké množství glykačních produktů, pro které mají pacienti s AD zvýšený počet receptorů v oblasti mikroglií. Nejnáchylnější složkou jsou nenasycené mastné kyseliny nacházející se v mozku na neuronální

¹³ *Genetic's home reference: Your guide to understanding genetic conditions* [online]. 2013, 2014 [cit. 2014-03-04]. Dostupné z: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/PSEN1>

¹⁴ *Genetic's home reference: Your guide to understanding genetic conditions* [online]. 2008, 2014 [cit. 2014-03-04]. Dostupné z: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/PSEN2>

membráně. ROS tyto lipidy napadají a spouštějí tak řetězovou reakci – peroxidaci. Po tomto zásahu nervové buňky odumírají.¹⁵

2. **Tvorba sterilního zánětu** – kvůli napadené tkáni hromadícím se β -amyloidem a následně plakům, dochází k vyvolání imunitní reakce. Gliové buňky produkují cytokiny a volné radikály (obr. č. 4). Následně se zvyšuje tvorba zánětlivé izoformy cyklooxygenázy 2 a nervové buňky odumírají.¹⁶



Obr. č. 4: Vznik sterilního zánětu a následná smrt neuronu

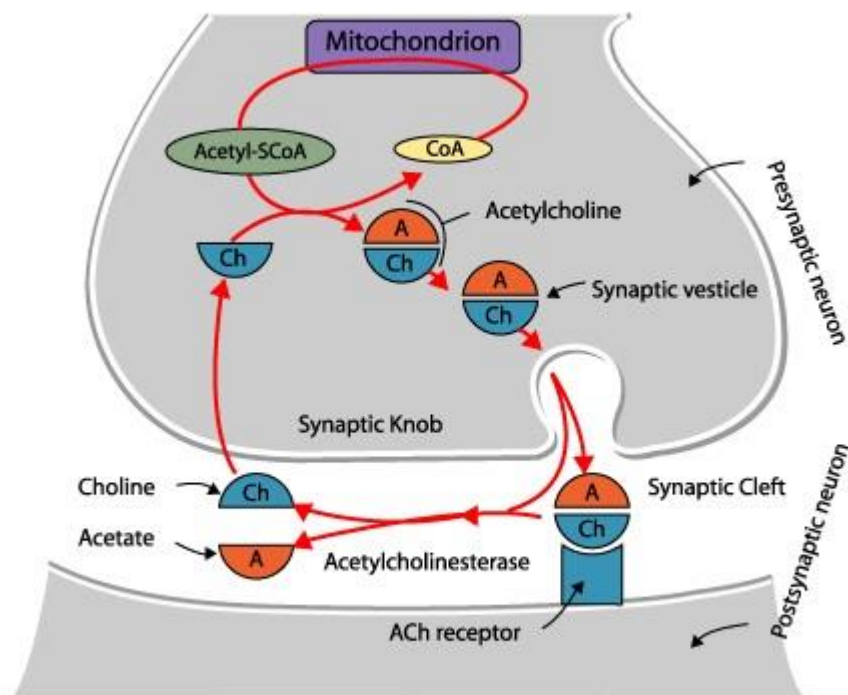
Vysvětlivky: APOE – apolipoprotein E, A β – β amyloid, LRP1 – receptor vážící APOE, APP - amyloidový prekurzorový protein, inflammatory cytokines – cytokiny zahajující zánětlivou reakci, cell death – buněčná smrt neuronu

Zdroj: <http://i293.photobucket.com/albums/mm53/nexavar/alzheimer/10f5.jpg>

¹⁵ SKOUMALOVÁ, A. Periferní markery oxidačního stresu u Alzheimerovy choroby. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2011, č. 4, 218–222.

¹⁶ JIRÁK, Roman. SOUČASNÉ TRENDY V KOGNITIVNÍ FARMAKOTERAPII ALZHEIMEROVY CHOROBY. *Neurologie pro praxi: Z pomezí neurologie*. 2002, č. 2, s. 101-105.

3. **Excitotoxicita a nadměrné působení vápenatých iontů** – neurony obsahují kalciové kanály, kterými do nich pronikají extracelulární vápenaté ionty. U AD dochází k nadměrnému působení excitačních aminokyselin, které otevírají přes ionotropní receptory kalciové kanály, a tím způsobují chemickou nerovnováhu uvnitř buňky a její destabilizaci. Následkem je neuronální smrt, po které následuje uvolnění excitačních aminokyselin z odumřelé buňky a celá reakce se řetězově opakuje.¹⁷
4. **Deficit acetylcholinu (ACh)** – ACh vzniká z acetyl-koenzymu A a cholinu (obr. č. 5), slouží jako neuromediátor nejen v paměťových mechanismech. Při AD dochází k degeneraci cholinergních neuronů, především na jejich presynaptické části. Největší defekt se vyskytuje v oblasti nucleus basalis Meynerti, což je hlavní zdroj cholinergní inervace mozkové kůry.¹⁸



Obr. č. 5: Tvorba acetylcholinu

¹⁷ PREISS, Marek et al. *Klinická neuropsychologie*. Praha 7: Grada Publishing, spol. s.r.o., 1998. ISBN 80-7169-443-6. s. 140.

¹⁸ PREISS, Marek et al. *Klinická neuropsychologie*. Praha 7: Grada Publishing, spol. s.r.o., 1998. ISBN 80-7169-443-6. s. 140

Vysvětlivky: A – acetát, Ch – cholin, Acetyl–SCoA – acetylkoenzym A, CoA – koenzym A

Zdroj: <http://www.frca.co.uk/images/acetylcholine.jpg>

3.5 Průběh AD

Typický průběh AD je charakterizován záludným začátkem a pomalu se rozvíjejícími symptomy po mnoho let. Mezi první příznaky patří ztráta krátkodobé paměti, projevující se opakováním otázek a vyjádření, zapomínáním na schůzky, zakládáním věcí na špatná místa a opomíjením důležitých detailů o různých záležitostech.

V počáteční fázi nejsou tyto symptomy příliš patrné, mohou se projevovat jen jako mírný pokles schopností pacienta vykonávat složitější úkoly. V tomto období má jedinec problémy s orientací, bývá zmatený, nemá tušení, jaké je datum nebo se ztrácí. S postupně rozvíjející se nemocí jsou pacienti často odkázáni na pomoc svého okolí a to hlavně v oblastech týkající se hospodaření s penězi, nakupování, řízení a napomáhání s rozvrhem.

V další fázi AD je zapotřebí dohled pečovatele, na kterém jsou pacienti silně závislí.

V konečném stádiu jsou zcela odkázáni na pomoc ostatních, zapomínají identitu svých blízkých a mohou být upoutáni na lůžko. Bezprostřední příčinou smrti je obvykle vdechnutí cizího tělesa (aspirace) nebo infekce.¹⁹

3.6 Diagnostika

Diagnostiku AD můžeme posoudit buď z klinických a anamnestických údajů nebo pomocí následujících testů. Mezi nejznámější a nejvíce používaný screeningový test patří Minimental State Examination (MMSE). Jeho funkce pro diagnostiku je ovšem přeceňována, často poskytuje falešně pozitivní výsledky nebo nerozezná časnou formu AD, která je pro terapii velice důležitá. Je vhodný

¹⁹ MUSIEK, E.S. a S.E. SCHINDLER. Alzheimer disease: current concepts & future directions. *Missouri Medicine*. 2013, č. 110, s. 395-400.

spíše na monitorování průběhu onemocnění. Hranicí pro vznik demence je škála pod 24 bodů.²⁰ (tab. č. 1)

Tab. č. 1: Vyhodnocení MMSE testu

Vyhodnocení MMSE testu	
30 - 27 bodů	normální kognitivní funkce
26 - 25 bodů	může jít o lehkou poruchu kognitivních funkcí nebo počáteční demenci - je vhodné pacienty sledovat
24 - 18 bodů	lehká forma demence
17 - 6 bodů	středně těžká forma demence
6 - méně	těžká forma demence

Pro přesnější diagnostiku jsou zapotřebí senzitivnější testy, jako je např. Adenbroek Cognitive Examination (ACE), paměťový test učení, kdy zkusíme pacienta pomocí 15 slov, Bentonův retenční test zkoušecí vizuální paměť atd.

Mezi komplexní testy prověřující všechny složky paměti patří Wechslerův test nebo Cambridge Cognitive Examination (CAMCOG). Pomocí těchto testů můžeme diagnostikovat i časná stádia nemoci, jedinou nevýhodou je jejich časová náročnost.²¹

K potvrzení konečné diagnózy jsou používány tzv. biomarkery. Jejich úlohou je včasné odhalení AD. Patří mezi ně zobrazovací metody (výpočetní tomografie – CT nebo magnetická resonance – MRI), které slouží k identifikaci atrofie mozku a rozšíření komorového systému. Dále hodnota některých proteinů oproti zdravým jedincům (tau protein, beta amyloid) nebo poruchy epizodické paměti, která je postižena jako první.²²

Přesto se demence diagnostikuje stále příliš pozdě. Důležité je i zapojení rodinných příslušníků nebo pečovatele, kteří nám pomáhají s hodnocením denního života pacienta.

²⁰ RESSNER, Pavel. ALZHEIMEROVA CHOROBA – DIAGNOSTIKA A LÉČBA. *Neurologie pro praxi*. 2004, č. 1.

²¹ RESSNER, Pavel. ALZHEIMEROVA CHOROBA – DIAGNOSTIKA A LÉČBA. *Neurologie pro praxi*. 2004, č. 1.

²² JIRÁK, Roman. DIAGNOSTIKA A TERAPIE ALZHEIMEROVY CHOROBY. *Neurologie pro praxi*. 2008, č. 4, 240–244.

3.7 Terapie

Pro terapii AD jsou prozatím schváleny a klinicky ověřeny medicínou založenou na důkazech (EBM) pouze dvě skupiny léčiv. První skupina je zaměřena na deficit cholinergního systému a zároveň je i lékem první volby. Jsou to inhibitory AChE působící v CNS, které jsou rozděleny podle jejich chemické struktury.

První jsou piperidinové deriváty, kde je hlavním zástupcem donepezil. V současné době je to jeden z nejvíce užívaných léků proti AD na světě. Odbourává se pomocí cytochromu P 450, přesto nemá mnoho lékových interakcí. Není hepatotoxický, počáteční dávka je jedenkrát denně 5 mg, při dobré toleranci se po měsíci se zvyšuje na 10 mg.²³

Další významné látky jsou karbamátové deriváty, kam patří fyzostigmin, který se nyní používá spíše jako antidotum při otravě NPL nebo pro experimentální účely.²⁴ Významnějším zástupcem je rivastigmin. Jeho specifický účinek spočívá v tom, že neinhibuje pouze AChE, ale i butyrylcholinesterasu, která také rozkládá ACh a jejíž činnost je při AD zvýšena. Jediným nedostatkem je častější výskyt nežádoucích účinků především gastrointestinálních, kterým lze předejít postupným titrováním dávky po dobu čtyř měsíců. Začíná se 1,5 mg dvakrát denně, po 4 týdnech se zvýší na 3mg dvakrát denně, za další 4 týdny se podává dvakrát denně 4,5mg a konečnou dávkou je 6 mg dvakrát denně. Při přerušení dávek více jak 3 dny je nutné začít nižší dávkou, aby se předešlo nežádoucím účinkům.²⁵

Posledním používaným inhibitorem je alkaloid galantamin. Tato látka je charakteristická svým duálním mechanismem účinku, jelikož inhibuje AChE, ale i allostericky moduluje nikotinové receptory. Tím zlepšuje uvolňování ACh z presynaptického zakončení. Dávku je také nutné titrovat po dobu tří měsíců, v retardované formě jej lze podávat jen jednou denně. Začíná se na 8 mg

²³ JIRÁK, Roman. SOUČASNÉ TRENDY V KOGNITIVNÍ FARMAKOTERAPII ALZHEIMEROVY CHOROBY. *Neurologie pro praxi: Z pomezí neurologie*. 2002, č. 2, s. 101-105.

²⁴ PATOČKA, Jiří. Látky psychicky zneschopňující. In: *Univerzita obrany* [online]. 2013 [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: http://www.unob.cz/fvz/struktura/k304/Documents/latky_psychicky_zneschopnujici.pdf

²⁵ JIRÁK, Roman a Kateřina VNOUČKOVÁ. Rivastigminum. *Remedia*. 2003, č. 6, 372–378.

jedenkrát denně (dvakrát denně 4 mg), po 4 týdnech se zvyšuje na 16 mg jedenkrát denně (dvakrát denně 8 mg) a končí se na 24 mg jedenkrát denně (dvakrát 16mg).²⁶

Druhá skupina obsahuje látky, které inhibují NMDA (N-metyl-D-aspartátové) receptory. Jediným dosud používaným zástupcem je memantin. Jeho hlavním úkolem je inhibice NMDA receptorů, jelikož při AD jsou tyto receptory nadměrně aktivované excitačními aminokyselinami a tento jev způsobuje excitotoxicitu. Dávkování probíhá postupně, začíná se 5 mg jedenkrát denně a každý týden se přidá 5 mg. Konečnou terapeutickou dávkou je dvakrát denně 10mg. Má minimum nežádoucích účinků.²⁷

Z nefarmakologického hlediska je v terapii AD důležitá reedukace, s pacientem se musí procvičovat funkce, které ještě zůstaly zachovány, nikoli ty, které už neovládá. Dále je důležitá spolupráce s pečovateli o nemocné nebo s nejbližšími příbuznými, na které je v tomto období vynaložena velká emoční zátěž. Rodina musí pochopit, že léčba nepovede k vyléčení, pouze zpomalí průběh nebo zlepší stav nemocného na přechodnou dobu. V konečném stádiu jsou pacienti často hospitalizováni.²⁸

²⁶ JIRÁK, Roman. DIAGNOSTIKA A TERAPIE ALZHEIMEROVY CHOROBY. *Neurologie pro praxi*. 2008, č. 4, 240–244.

²⁷ JIRÁK, Roman. DIAGNOSTIKA A TERAPIE ALZHEIMEROVY CHOROBY. *Neurologie pro praxi*. 2008, č. 4, 240–244.

²⁸ JIRÁK, Roman. DIAGNOSTIKA A TERAPIE ALZHEIMEROVY CHOROBY. *Neurologie pro praxi*. 2008, č. 4, 240–244.

4. Cíl

Cílem této diplomové práce bylo stanovit a porovnat inhibiční potenciál standardních inhibitorů AChE (takrin, 7-metoxytakrin, rivastigmin, donepezil) s nově nasyntetizovanými látkami (K298, K344, K474). Inhibitory AChE jsou obecně využívány v terapii Alzheimerovy choroby (AD) či myastenie gravis, ve vojenské sféře se využívají jako profylaxe při zasažení nervově paralytickými látkami (NPL).

Získané výsledky by měly napovědět, zda jsou nové sloučeniny účinnějšími inhibitory AChE a jaký vliv má na tuto inhibici způsob podání látky. Zároveň by mohly sloužit jako podklad pro vývoj nových léků v terapii AD či jako možná profylaktika NPL.

5. Metodika

5.1 Zvířata

Pokusy probíhaly na samcích potkanů kmene Wistar (Velaz, s.r.o., Praha, Česká republika) v prvním pokusu o váze 260-350 g a ve druhém o váze 170-220 g. Potkani byli ustájeni v klimatizované místnosti (stálá teplota 22 ± 2 °C, vlhkost 50 ± 10 %, světelný cyklus 12 hod světlo/ 12 hod tma), krmeni klasickou peletovou dietou a vodou ad libitum.

Zvířata byla vždy rozdělena do 9 skupin po 6 jedincích. Experiment probíhal pod dohledem Etické komise Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové. Personál manipulující s pokusnými zvířaty byl předem řádně proškolen a získal osvědčení o způsobilosti pracovat s laboratorními zvířaty podle §17 odst. 1 zákona č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat.

5.2 Příprava základních roztoků

Tris pufr 0,1 M

Zásobní roztok pro přípravu Tris pufru vznikne rozpuštěním 24,2 g 1,1,1-tris-hydroxymethyl-aminomethanu v 1000,0 ml destilované vody. 250,0 ml zásobního roztoku se doplní na objem 950,0 ml a upraví se pH pomocí pH metru na 7,6 pomocí kyseliny chlorovodíkové (HCl). Poté se kádinka doplní destilovanou vodou na konečný objem 1000,0 ml.

Tris pufr 0,02 M

100,0 ml 0,1 M Tris pufru se doplní do 450,0 ml destilovanou vodou, upraví se pH pomocí pH metru a HCl na 7,6 a doplní destilovanou vodou do 500,0 ml.

Acetylthiocholin jodid (ATChJ)

0,029 g ATChJ se rozpustí do 10 ml destilované vody. Tento roztok se rozpipetuje po 1 ml a uchovává se v mrazáku při -12°C. K pokusům se používá rozmražený 1 ml naředěný do 10 ml destilovanou vodou.

5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB)

0,1 g DTNB se rozpustí ve 100,0 ml 0,1 M tris pufru. Roztok DTNB je nestálý na světle, proto je uchováván během pokusu v baňce obalené alobalem a připravovaný vždy v čase potřeby.

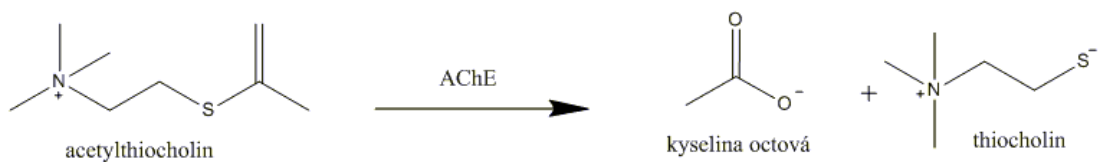
Cystein chlorid

Ke kalibraci se používá 1 ml zásobního cystein chloridu. Zásobní roztok je připraven rozpuštěním 0,03152 g cystein chloridu ve 200 ml destilované vody. Vytvoří se koncentrační řada čtyř koncentrací cystein chloridu a je změřena kalibrační řada.

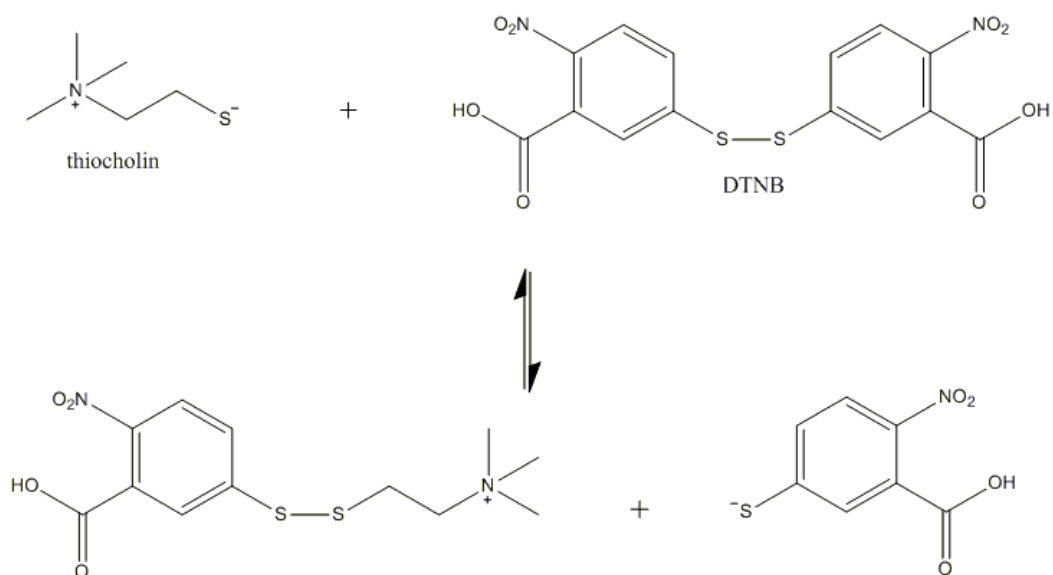
5.3 Princip metody

Inhibiční potenciál látek byl měřen kolorimetrickou Ellmanovou metodou (Ellman,1961), která je založena na principu hydrolýzy substrátu acetylthiocholinu (ATCh). Po této enzymatické reakci je ATCh rozložen na kyselinu octovou a thiocholin. Thiocholin je molekula obsahující thiolovou (SH-) skupinu, která reaguje s 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinou (DTNB) za vzniku 5-merkaptu-2-nitrobenového aniontu a po rozštěpení disulfidického můstku v DTNB se naváže na zbylou SH- skupinu. Ve vzniklém aniontu dochází ke konjugaci dvojných vazeb a lze ho detegovat spektrofotometrickou metodou při vlnové délce 412 nm (obr. č. 6).²⁹

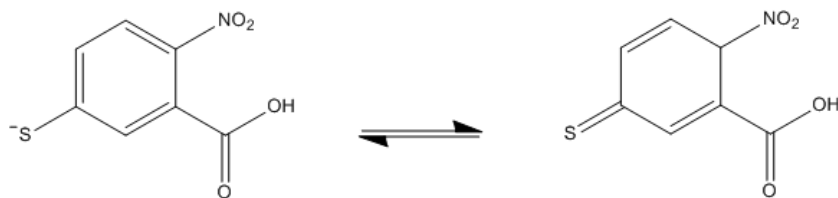
²⁹ ŽDÁROVÁ KARASOVÁ, J., K. KUČA, D. JUN a J. BAJGAR. UŽITÍ ELLMANOVY METODY PRO STANOVENÍ AKTIVIT CHOLINESTERAS PŘI IN VIVO HODNOCENÍ ÚČINKŮ REAKTIVÁTORŮ. *Chemické listy: Laboratorní přístroje a postupy*. 2010, č. 104, s. 46-50.



1.reakce : Rozklad ATCh na kyselinu octovou a thiocholin pomocí acetylcholinesterázy



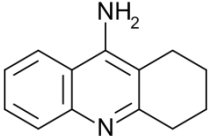
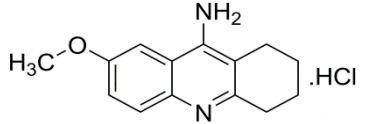
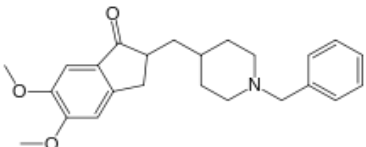
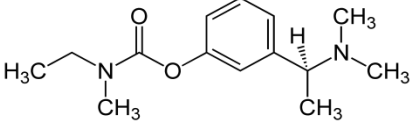
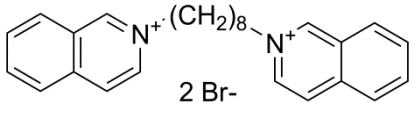
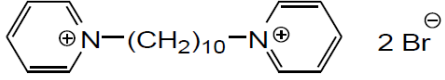
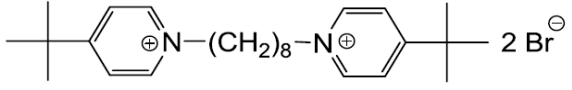
2.reakce : Štěpení DTNB a vznik chromoforu



3.reakce : Přechod chromoforu na formu, která je fotometrována

Obr. č. 6: Princip Ellmanovy metody

Tab. č. 2: Chemické struktury testovaných látek

Chemická struktura	Název
	Takrin
	7-MEOTA
	Donepezil
	Rivastigmin
Nové inhibitory AChE	
	K 298
	K 344
	K 474

5.4 Postup stanovení aktivity inhibitorů AChE

1. v krvi:

Odebraný vzorek heparinizované krve se nejprve promíchá, poté se z něj odebere do zkumavky 100 μ l a smíchá se s 1,9 ml 0,02 M pufru. Zkumavka se nechá stát, dokud nedojde k mírnému projasnění (hemolýze). Poté se do kyvety napipetuje 1,7 ml DTNB, 100 μ l připraveného hemolyzátu a celá reakce se odstartuje přidáním 200 μ l ATCh. Kyveta se promíchá a vloží do spektrofotometru, kde se měří příslušná absorbance při vlnové délce 436 nm po dobu 2 minut.

2. v mozku:

Nejprve se určí hmotnost daného mozku. Vzorek je v poměru 1:10 naředěn 0,02 M puftrem a poté je vše homogenizováno homogenizátorem (DI-25 Basic, IKA Werke, Německo). Dále je postup stejný jako u krve, do kyvety o objemu 2,5 ml se napipetuje 1,7 ml DTNB, 100 μ l připraveného homogenizátu a 200 μ l ATCh. Kyveta se promíchá a vloží do spektrofotometru Helios Alpha (Elektron Corporation, Oxford, Velká Británie), kde se měří příslušná absorbance při vlnové délce 412 nm po dobu 8 minut.

3. v bránici:

Stejný postup jako u mozku, měření probíhá po dobu 10 minut. Toto zpoždění je kvůli zreagování volných thiolů ve vzorcích, aby se předešlo naměření falešně pozitivních výsledků.

5.5 Uspořádání pokusů

Vlastní práce byla rozdělena do dvou etap. V první etapě byli potkani rozděleni do 9 skupin po 6 pokusných zvířatech. První skupina byla kontrolní (K), které byl podáván fyziologický roztok místo testované látky. Ostatním osmi skupinám byly podávány inhibitory AChE, konkrétně to byl takrin, 7-meota, donepezil a rivastigmin vždy ve dvou různých koncentracích odpovídajících 5 a 20 % LD₅₀ (střední smrtná dávka). Vzorky byly odebírány 15 minut po intraperitoneální aplikaci (i.p.) inhibitorů.

V druhé etapě byly podávány potkanům nově nasyntetizované látky K 298, K 344 a K 474 opět ve dvou různých koncentracích (5 a 20 % LD₅₀) a 7-meota s takrinem v koncentracích odpovídajících 20 % LD₅₀. Lišil se však způsob podání inhibitorů, který probíhal intramuskulárně (i.m.) a vzorky byly odebrané po 30 minutách od jejich aplikace.

5.6 Zpracování výsledků

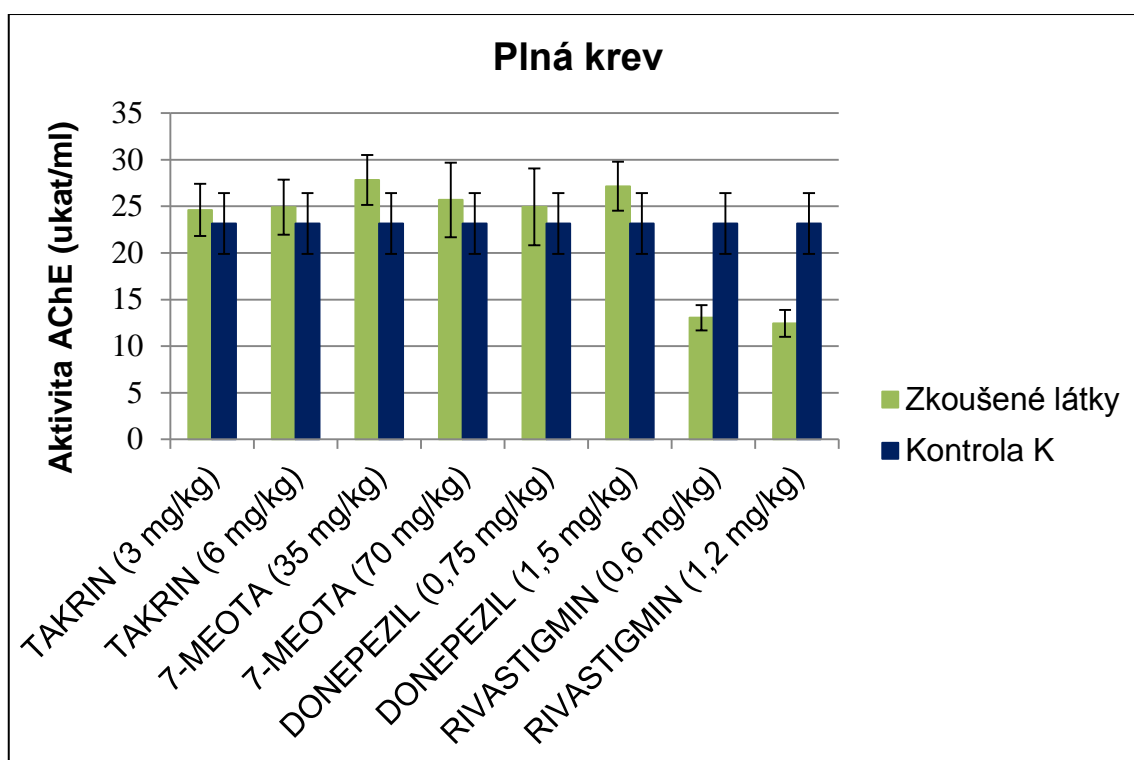
Do programu Microsoft Excel 2010 byly zaznamenány dvě naměřené hodnoty absorbancí jednotlivých vzorků. Tyto hodnoty byly zprůměrovány. Výsledné hodnoty aktivity enzymu byly dosaženy po započítání kalibrační řady a ředění vzorku. Do počítačového statistického programu GraphPad Prism 5.0 byly zadány hodnoty odpovídající aktivitě enzymu a vypočítány statistické významnosti. Takto byla určena aktivita AChE v jednotlivých orgánech u všech testovaných inhibitorů AChE.

6. Výsledky

V počítačovém programu Microsoft Excel byly vytvořeny grafy znázorňující aktivitu AChE (v $\mu\text{kat/ml}$) po podání inhibitoru v porovnání s kontrolním roztokem K, který neobsahuje inhibitor, jedná se pouze o vzorek s přidaným fyziologickým roztokem. Dále jsou v grafech vyznačeny směrodatné odchylky měření.

Čím nižší je hodnota aktivity AChE v porovnání s kontrolním roztokem K, tím větší inhibiční potenciál zkoušených látek lze pozorovat.

Graf č. 3: Porovnání aktivity AChE v krvi s podanými inhibitory

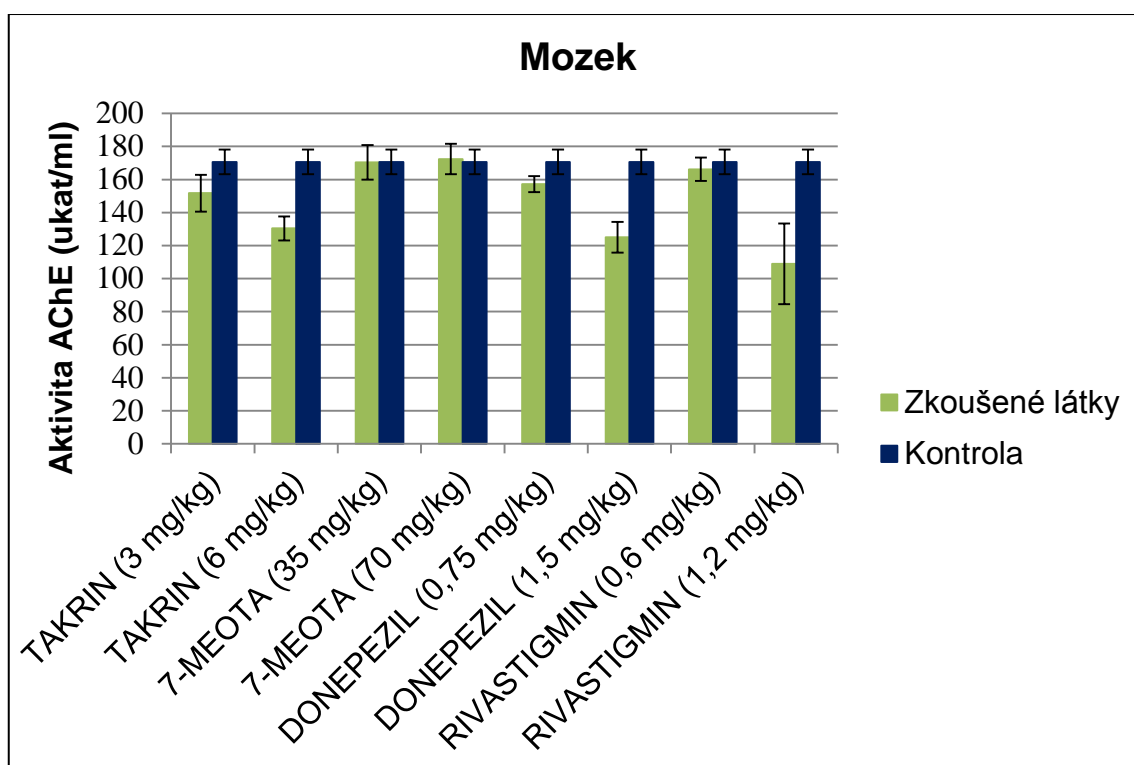


Tab. č. 3: Vyhodnocení aktivity AChE v krvi (%)

Aktivita AChE vyjádřená v procentech (%)	
Kontrola K (fyziologický roztok)	100
TAKRIN (3 mg/kg)	106,30
TAKRIN (6 mg/kg)	107,56
7-MEOTA (35 mg/kg)	120,16
7-MEOTA (70 mg/kg)	110,92
DONEPEZIL (0,75 mg/kg)	107,77
DONEPEZIL (1,5 mg/kg)	117,27
RIVASTIGMIN (0,6 mg/kg)	56,35
RIVASTIGMIN (1,2 mg/kg)	53,76

Z tabulky jasně vyplývá, že jediným funkčním inhibitorem je rivastigmin, který statisticky snižuje aktivitu AChE v krvi a to až na polovinu hodnoty kontrolní aktivity.

Graf č. 4: Porovnání aktivity AChE v mozcích s podanými inhibitory

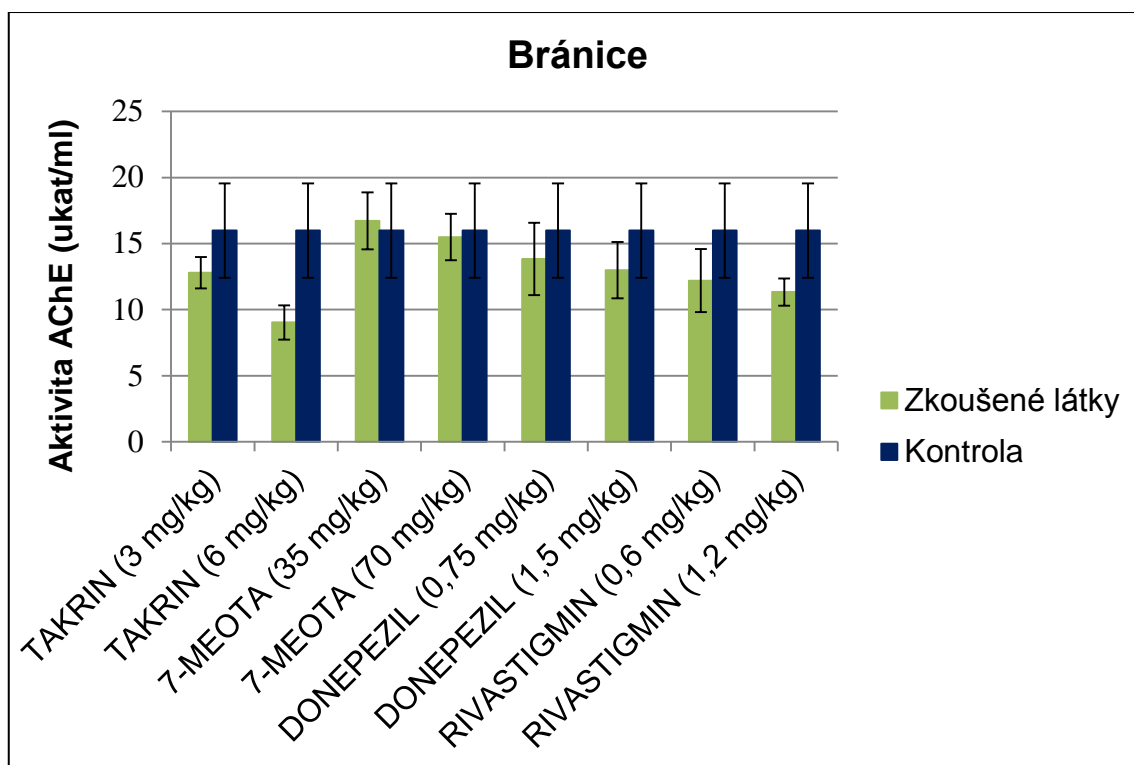


Tab. č. 4: Vyhodnocení aktivity AChE v mozcích (%)

Aktivita AChE vyjádřená v procentech (%)	
Kontrola K (fyziologický roztok)	100
TAKRIN (3 mg/kg)	88,92
TAKRIN (6 mg/kg)	76,44
7-MEOTA (35 mg/kg)	99,88
7-MEOTA (70 mg/kg)	101,55
DONEPEZIL (0,75 mg/kg)	92,21
DONEPEZIL (1,5 mg/kg)	73,27
RIVASTIGMIN (0,6 mg/kg)	97,74
RIVASTIGMIN (1,2 mg/kg)	63,83

V mozcích se nejvíce projevila inhibice u látek podaných ve vyšší koncentraci, konkrétně u takrinu, donepezilu a rivastigminu. Tento výsledek lze očekávat, jelikož donepezil a rivastigmin jsou standardními látkami v terapii AD.

Graf č. 5: Porovnání aktivity AChE v bránicích s podanými inhibitory



Tab. č. 5: Vyhodnocení aktivity AChE v bránicích (%)

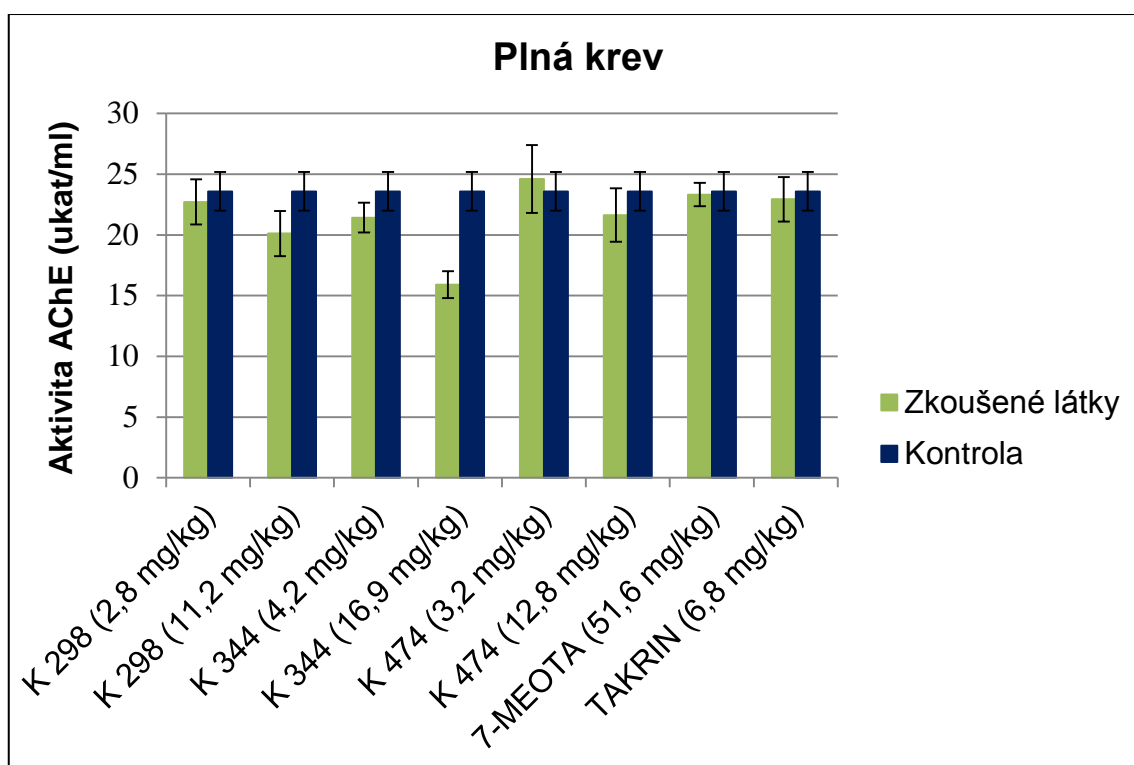
Aktivita AChE vyjádřená v procentech (%)	
Kontrola K (fyziologický roztok)	100
TAKRIN (3 mg/kg)	80,05
TAKRIN (6 mg/kg)	56,47
7-MEOTA (35 mg/kg)	104,57
7-MEOTA (70 mg/kg)	96,87
DONEPEZIL (0,75 mg/kg)	86,55
DONEPEZIL (1,5 mg/kg)	81,24
RIVASTIGMIN (0,6 mg/kg)	76,30
RIVASTIGMIN (1,2 mg/kg)	70,86

V této tabulce lze zaznamenat inhibici u takrinu a rivastigminu v obou koncentracích. Mírnou inhibici je možno pozorovat i u donepezilu, ale jen u podané vyšší koncentrace látky.

V první skupině vzorků 7-MEOTA nevykazuje v žádném případě výraznou inhibici, tudíž neprokazuje žádné předpoklady pro využití v terapii AD. Nejlépe se osvědčil rivastigmin, již používaný jako standardní látka, donepezil a takrin hlavně ve vyšších koncentracích.

Ve druhém pokusu byly testovány nové inhibitory K 298, K 344 a K 474 společně s 7-meotou a takrinem lišící se způsobem podání oproti první etapě. Usmrcení potkanů proběhlo po 30 minutách od i.m. aplikace inhibitorů.

Graf č. 6: Porovnání aktivity AChE v krvi s podanými inhibitory

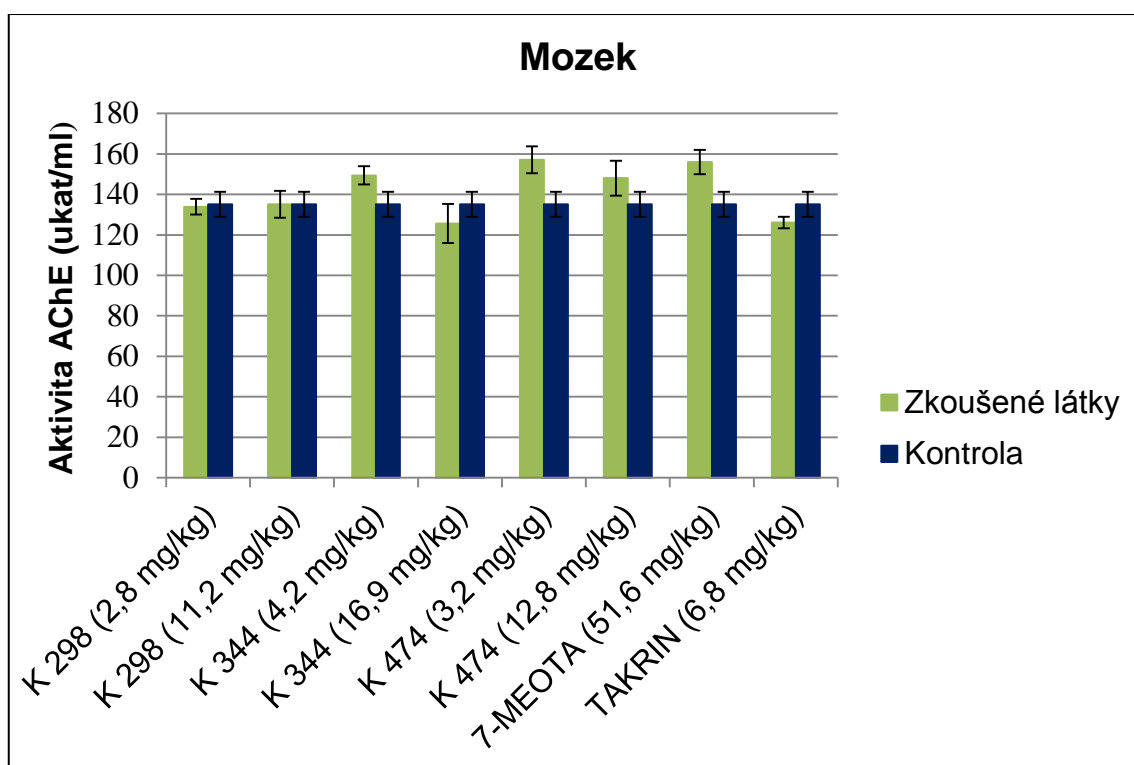


Tab. č. 6: Vyhodnocení aktivity AChE v krvi (%)

Aktivita AChE vyjádřená v procentech (%)	
Kontrola K (fyziologický roztok)	100
K 298 (2,8 mg/kg)	96,31
K 298 (11,2 mg/kg)	85,28
K 344 (4,2 mg/kg)	90,84
K 344 (16,9 mg/kg)	67,39
K 474 (3,2 mg/kg)	104,33
K 474 (12,8 mg/kg)	91,73
7-MEOTA (51,6 mg/kg)	98,90
TAKRIN (6,8 mg/kg)	97,24

Z této tabulky vykazuje výraznou inhibici AChE pouze jedna látka a to K 344 v koncentraci 16,9 mg/kg. Nepatrná inhibice je i u K 298 ve vyšší koncentraci, ostatní inhibice jsou zanedbatelné.

Graf č. 7: Porovnání aktivity AChE v mozcích s podanými inhibitory

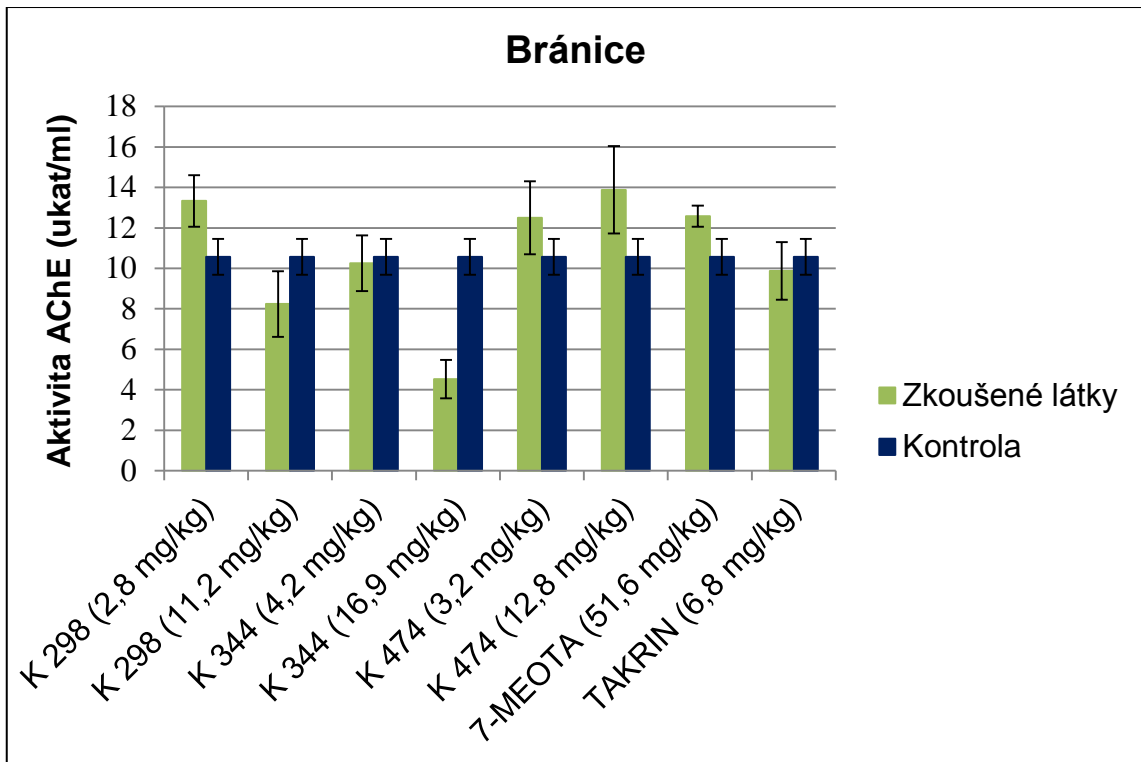


Tab. č. 7: Vyhodnocení aktivity AChE v mozcích (%)

Aktivita AChE vyjádřená v procentech (%)	
Kontrola K (fyziologický roztok)	100
K 298 (2,8 mg/kg)	99,11
K 298 (11,2 mg/kg)	100
K 344 (4,2 mg/kg)	110,58
K 344 (16,9 mg/kg)	92,97
K 474 (3,2 mg/kg)	116,28
K 474 (12,8 mg/kg)	109,55
7-MEOTA (51,6 mg/kg)	115,47
TAKRIN (6,8 mg/kg)	93,34

V mozcích není statisticky významná inhibice u žádné z testovaných látek. Pouze nepatrné (statisticky nevýznamné) snížení aktivity AChE lze pozorovat u inhibitoru K 344 ve vyšší koncentraci a u takrinu.

Graf č. 8: Porovnání aktivity AChE v bránicích s podanými inhibitory



Tab. č. 8: Vyhodnocení aktivity AChE v bránicích (%)

Aktivita AChE vyjádřená v procentech (%)	
Kontrola K (fyziologický roztok)	100
K 298 (2,8 mg/kg)	126,11
K 298 (11,2 mg/kg)	77,98
K 344 (4,2 mg/kg)	96,97
K 344 (16,9 mg/kg)	42,82
K 474 (3,2 mg/kg)	118,26
K 474 (12,8 mg/kg)	131,32
7-MEOTA (51,6 mg/kg)	119,02
TAKRIN (6,8 mg/kg)	93,38

V bránicích byla zjištěna inhibice u stejných látek jako v krvi, tedy K 298 a K 344 při vyšších koncentracích.

Ve druhé skupině lze pozorovat, že pouze u dvou nových látek byl naměřen inhibiční potenciál, a to u K 298 (11,2 mg/kg) a K 344 (16,9 mg/kg). Bohužel snižují aktivitu AChE spíše v krvi a bránicích, zatímco k terapii AD je nejdůležitější účinek v mozcích.

7. Diskuze

U první části testovaných inhibitorů AChE byla zvolena i.p. aplikace, u které lze očekávat rychlejší nástup účinku, proto odběr orgánů probíhal již po 15 min od aplikace. Největší výhodou je, že inhibitor obchází first pass efekt, nebo-li účinek prvního průchodu játry, který způsobuje částečnou metabolizaci léku před jeho vstupem do systémové cirkulace. Zatímco i.m. způsob je určen spíše pro látky tvořící depozitum s postupným uvolňováním. Záleží na rychlosti prokrvení určité oblasti, hustotě kapilárního řečiště a kompozici pojivové tkáně.

Testovaná metoda, pomocí které se zjišťovala reverzibilní inhibice AChE, byla na pracovišti zkoušena poprvé. Doposud se měřila aktivita AChE pouze po zasažení NPL, tedy ireverzibilní inhibice. Na standardně používaných látkách se prokázala účinnost této metody s tím, že nezávisí na naředění vzorku, protože vazba inhibitoru na enzym nadále přetrvává.

Mezi nejdůležitější vlastnosti inhibitorů AChE vhodných pro terapii AD patří dobrý přestup přes hematoencefalickou bariéru (HEB) a následné působení v CNS, nikoliv na periférii, kde by mohly způsobit řadu nežádoucích účinků.³⁰ Dále specifická vazebnost na mozkové formy AChE. V lidském mozku zdravého jedince převládá tetramerní forma G4 nad monomerní formou G1. Tento poměr se při AD výrazně mění, zvyšuje se množství G1 a klesá G4. Další změnou je aktivita enzymu butyrylcholinesterasy, která je aktivována gliovými buňkami v oblasti plaků a zvyšuje odbourávání ACh.³¹

Na přestup přes HEB má vliv chemická struktura látky. Do CNS prostupují látky lipofilní, s malou molekulou, obsahující terciální dusík, bez náboje. Naopak těžce dostupné jsou látky, které obsahují kvarterní dusík, jsou hydrofilní nebo nesou jakýkoliv kladný náboj. Ze struktury testovaných látek je zřejmé, že do CNS dobře proniká donepezil, rivastigmin a takrin, jelikož

³⁰ JIRÁK, Roman. Farmakoterapie kognitivních funkcí u Alzheimerovy choroby. In: *Centrum duševního zdraví* [online]. 2010 [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: <http://www.cdzjesenik.cz/Ter.kognit.por.uAlheimera.pdf>

³¹ JIRÁK, Roman. SOUČASNÉ TRENDY V KOGNITIVNÍ FARMAKOTERAPII ALZHEIMEROVY CHOROBY. *Neurologie pro praxi: Z pomezí neurologie*. 2002, č. 2, s. 101-105.

ve své molekule obsahují terciální dusík a jsou elektroneutrální. Nové inhibitory obsahují kladný náboj, který sice zvětšuje afinitu k AChE, ale zároveň znesnadňuje přestup přes HEB společně s kvarterním dusíkem uvnitř molekuly (tab. č. 2).

V prvním pokusu byly použity inhibitory, které již v praxi byly či jsou zavedeny. Takrin (9-amino-1,2,3,4-tetrahydro-acridine) je látka, která byla jako první roku 1993 schválena úřadem pro kontrolu léčiv a potravin (FDA) pro terapii AD. Výsledky potvrzují jeho aktivitu v centrální nervové soustavě, ovšem z důvodu jeho nežádoucích účinků způsobující poškození jater byl tento lék pro léčbu AD stažen z trhu.³²

Další testovanou látkou je 7-MEOTA (9-amino-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridine), derivát takrinu. Byla nasyntetizována za účelem snížit nežádoucí účinky takrinu, především hepatotoxicitu. Tento cíl byl splněn, jelikož hlavním metabolitem 7-MEOTA je 7-hydroxytakrin, který dále konjuguje s kyselinou glukuronovou a je vyloučen močí.³³ Armáda České republiky používá 7-MEOTA spolu s fyzostigminem jako antidotum při otravě psychoaktivně zneschopňující látkou – BZ látkou, což je derivát kyseliny benzoové (3-chinuklidyl benzylát). Podává se po 8 hodinách i.m. 50 mg nebo orálně 100 mg.³⁴

Z naměřených výsledků bohužel vyplývá, že nevykazuje žádnou výraznou inhibici AChE, která by mohla být využita v terapii AD. Přesto se tento

³² KORABECNY, K. MUSILEK, F. ZEMEK, A. HOROVA, O. HOLAS, E. NEPOVIMOVÁ, V. OPLETALOVA, J. HROUDOVA, Z. FISAR, Y. JUNG a K. KUČA. Synthesis and in vitro evaluation of N-alkyl-7-methoxytacrine hydrochlorides as potential cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010, č. 20, s. 6093-6095.

³³ KORABECNY, J., K. MUSILEK, F. ZEMEK, A. HOROVA, O. HOLAS, E. NEPOVIMOVA, V. OPLETALOVA, J. HROUDOVA, Z. FISAR, Y. JUNG a K. KUČA. Synthesis and in vitro evaluation of 7-methoxy-N-(pent-4-enyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine—new tacrine derivate with cholinergic properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011, č. 21.

³⁴ PATOČKA, Jiří. Látky psychicky zneschopňující. In: *Univerzita obrany* [online]. 2013 [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: http://www.unob.cz/fvz/struktura/k304/Documents/latky_psychicky_zneschopnujici.pdf

derivát díky své menší toxicitě stal výchozí molekulou pro syntézu nových inhibitorů, které podléhají různé modifikaci (N - alkyl - 7 - methoxytakrin).³⁵

Další testovanou látkou je donepezil, který se stal ve světě nejběžnějším lékem pro terapii AD. Výsledky potvrdily jeho účinnost v centrální nervové soustavě, především ve vyšší koncentraci (20 % LD₅₀). Na periférii je inhibice menší, v krvi dokonce neprokázal žádnou, což je v terapii poškození kognitivních funkcí žádané. Tuto teorii potvrzuje i dvojité zaslepená studie zaměřena na funkci donepezilu. Pacienti byli náhodně rozděleni do tří skupin, jedné bylo podáváno placebo, druhé donepezil 5 mg a třetí 10mg. Po 24 týdnech bylo prokázáno zlepšení kognitivních funkcí u druhé a třetí skupiny. Z naměřených údajů vyplývá, že je donepezil bezpečnou látkou zvyšující poznávací a celkové funkce u pacientů s mírnou až středně těžkou formou AD.³⁶

Posledním zástupcem je rivastigmin, také standardně používaná látka. Z výsledků je zřejmá jeho inhibiční schopnost jak v CNS, tak na periférii a to i v nižších koncentracích. Vysvětlení spočívá v jeho duální inhibiční schopnosti na AChE a butyrylcholinesterase, která je v případě AD také zvýšena. Tím lze odůvodnit jeho nežádoucí účinky projevující se gastrointestinálními potížemi způsobené zvýšenou sekrecí žaludeční šťávy. Ve studiích na zvířatech byla srovnávána jeho účinnost s fyzostigminem, což je také karbamátový inhibitor. Inhibice AChE byla sice větší u fyzostigminu, ale rivastigmin prokazuje pětkrát větší poměr ve prospěch své inhibiční aktivity v CNS proti periferním orgánům.³⁷

V druhém pokusu se otestovanou metodou zkoumala inhibiční aktivita nově nasynthetizovaných inhibitorů společně s takrinem a 7-MEOTOU.

³⁵ KORABECNY, K. MUSILEK, F. ZEMEK, A. HOROVA, O. HOLAS, E. NEPOVIMOVÁ, V. OPLETALOVA, J. HROUDOVA, Z. FISAR, Y. JUNG a K. KUČA. Synthesis and in vitro evaluation of N-alkyl-7-methoxytacrine hydrochlorides as potential cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010, č. 20, s. 6093-6095.

³⁶ ROGERS, S.L., M.R. FARLOW, R.S. DOODY, R. MOHS a L.T. FRIEDHOFF. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil Study Group. *Neurology*. 1998, č. 1.

³⁷ JIRÁK, Roman a Kateřina VNOUČKOVÁ. Rivastigminum. *Remedia*. 2003, č. 6, 372–378.

Inhibitory K 298, K 344 a K 474 neprokázaly žádnou výraznou účinnost v CNS, která by mohla být v budoucnu využita pro terapii AD. Inhibiční potenciál byl naměřen v bránicích a mírně v krvi, tedy na periférii u K 298 a K 344. Aktivitu AChE nejvíce snižoval inhibitor K 344 přibližně o 45 %, K 298 jen o 20 %. Tyto látky byly doporučeny k dalšímu testování. Jejich inhibiční účinek byl srovnáván s pyridostigminem jako farmakologická premedikace (profylaxe) myší při otravě somanem. Z naměřených výsledků bylo zjištěno, že nejméně toxický je K 298, ovšem výrazná změna v profylaxi mezi hodnotami s premedikací nebo bez ní nebyla zjištěna.³⁸

Dalšími látkami byl takrin a 7-MEOTA, které byly podávány v koncentracích odpovídajících 20 % LD₅₀ stejně jako v první části, lišil se však způsob podání inhibitoru. Do organismu byl aplikován i.m. a usmrcení potkanů probíhalo až po 30 minutách. Z výsledků je patrné, že tento způsob aplikace se vyznačuje pomalejším nástupem účinku a na vyvolání stejného efektu je zapotřebí vyšší koncentrace látky. Z čehož lze usuzovat, že probíhá značná biotransformace inhibitorů při prvním průchodu játry. V tomto případě nebyla účinnost dostatečně velká, aby se projevila inhibicí AChE a mohla být využita v terapii AD.

Celkově výsledky potvrdily, že se pomocí Ellmanovy metody dají testovat i reverzibilní inhibitory AChE. Dále se prokázala účinnost standardních látek, využívající se v terapii AD. Bohužel nové inhibitory se zdají být neúčinné jak pro terapii AD, tak v premedikaci před NPL. Jejich nízká inhibiční aktivita v mozku bude s velkou pravděpodobností důsledkem jejich špatného prostupu HEB. Do budoucna je třeba hledat nové chemické struktury inhibitorů, které budou selektivní k AChE a zároveň budou dobře prostupovat do CNS. Periferní účinek by mohl být využit v léčbě jednak myasthenia gravis, u které dochází k autoimunitnímu poškození cholinergních receptorů a je třeba zvýšit množství ACh v synaptických spojích nebo jako profylaktická léčba před NPL.

³⁸KASSA, J., K. MUSILEK, M. KOOMLOVA a J. BAJGAR. A Comparison of the Efficacy of Newly Developed Reversible Inhibitors of Acetylcholinesterase with Commonly Used Pyridostigmine as Pharmacological Pre-Treatment of Soman-Poisoned Mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2012, č. 110, s. 322-326.

8. Závěr

Hlavním cílem této práce bylo ověření, zda je možné použít Ellmanovu metodu na testování aktivity AChE po podání reverzibilních inhibitorů. Dále se zjišťovala účinnost nově nasyntetizovaných inhibitorů, které by mohly být v budoucnu použity pro terapii AD.

Testovaná metoda prokázala svou účinnost na zkoušených standardech, které se již běžně používají při terapii AD. Z nově nasyntetizovaných látek se inhibiční aktivita projevila nepatrně pouze na periférii. V CNS nebyla bohužel naměřena žádná významná inhibice AChE, která by mohla být později prezentována jako podklad pro syntézu nových léčiv určené pro terapii AD.

Periferní účinek inhibitorů AChE by mohl být využit v terapii myasthenia gravis, kdy dochází k autoimunitnímu poškození receptorů na nervosvalovém přenosu. Dalším možným využitím je premedikace používaná především v armádním sektoru, sloužící jako profylaxe před NPL.

Pro větší účinek nových inhibitorů by bylo vhodné testování po i.p. podání látky, které by se mohlo projevit výraznější inhibicí AChE. Bohužel v terapii AD by tento výsledek nebyl příliš významný, jelikož i.p. způsob podání není pro pacienty využitelný.

9. Přehled zkratk

AD.....	Alzheimerova choroba
ACh.....	acetylcholin
AChE.....	acetylcholinesteráza
APOE.....	apolipoprotein E
APP.....	amyloidový prekurzorový protein
ATCh.....	acetylthiocholin
ATChJ.....	acetylthiocholin jodid
CNS.....	centrální nervový systém
DTNB.....	dithionitrobenzoová kyselina
FDA.....	úřad pro kontrolu léčiv a potravin
EBM.....	medicína založená na důkazech
HCl.....	kyselina chlorovodíková
HEB.....	hematoencefalická bariéra
I.M.....	intramuskulární podání
I.P.....	intraperitoneální podání
LD ₅₀	střední smrtná dávka
MMSE.....	Minimental State Examination
NPL.....	nervově paralytické látky
PSEN1.....	presenilin 1
PSEN2.....	presenilin 2
ROS.....	volné kyslíkové radikály

10. Seznam tabulek

Tabulka 1 Vyhodnocení MMSE testu.....	18
Tabulka 2 Chemické struktury testovaných látek.....	25
Tabulka 3 Vyhodnocení aktivity AChE v krvi (%).....	29
Tabulka 4 Vyhodnocení aktivity AChE v mozcích (%).....	30
Tabulka 5 Vyhodnocení aktivity AChE v bránicích (%).....	31
Tabulka 6 Vyhodnocení aktivity AChE v krvi (%).....	33
Tabulka 7 Vyhodnocení aktivity AChE v mozcích (%).....	34
Tabulka 8 Vyhodnocení aktivity AChE v bránicích (%).....	35

11. Seznam grafů

Graf 1 Přibližný výskyt jednotlivých typů demence.....	8
Graf 2 Závislost výskytu AD na věku.....	9
Graf 3 Porovnání aktivity AChE v krvi s podanými inhibitory.....	29
Graf 4 Porovnání aktivity AChE v mozcích s podanými inhibitory.....	30
Graf 5 Porovnání aktivity AChE v bránicích s podanými inhibitory.....	31
Graf 6 Porovnání aktivity AChE v krvi s podanými inhibitory.....	33
Graf 7 Porovnání aktivity AChE v krvi s podanými inhibitory.....	34
Graf 8 Porovnání aktivity AChE v bránicích s podanými inhibitory.....	35

12. Seznam obrázků

Obrázek 1 Porovnání zdravého a postiženého mozku s AD.....	10
Obrázek 2 Vznik amyloidních plaků a neurofibrilárních klubek.....	12
Obrázek 3 Tvorba komplexu Apo-E a β -amyloidu za vzniku amyloidních plaků	13
Obrázek 4 Vznik sterilního zánětu a následná smrt neuronu.....	15
Obrázek 5 Tvorba acetylcholinu.....	16
Obrázek 6 Tvorba acetylcholinu.....	24

13. Seznam literatury

ALZHEIMER'S DISEASE FACTS AND FIGURES. *Alz.org: alzheimer's association* [online]. 2013 [cit. 2014-02-22]. Dostupné z: https://www.alz.org/alzheimers_disease_facts_and_figures.asp

Genetic's home reference: Your guide to understanding genetic conditions [online]. 2008, 2014 [cit. 2014-03-03]. Dostupné z: <http://www.ghr.nlm.nih.gov/gene/APOE>

Genetic's home reference: Your guide to understanding genetic conditions [online]. 2013, 2014 [cit. 2014-03-04]. Dostupné z: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/PSEN1>

Genetic's home reference: Your guide to understanding genetic conditions [online]. 2008, 2014 [cit. 2014-03-04]. Dostupné z: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/PSEN2>

HOLMES, C., D. BOCHE, D. WILKINSON, G. YADEGARFAR, V. HOPKINS, A. BAYER, R. JONES, R. BULLOCK, S. LOVE, J. NEAL, E. ZOTOVA a J. NICOLL. Long-term effects of A β 42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet*. 2008, č. 372, 216–223.

JIRÁK, Roman et al. *Demence*. Praha 4: Maxdorf s.r.o., 1999. ISBN 80-85800-44-6. s. 110

JIRÁK, Roman. DIAGNOSTIKA A TERAPIE ALZHEIMEROVY CHOROBY. *Neurologie pro praxi*. 2008, č. 4, 240–244.

JIRÁK, Roman. Farmakoterapie kognitivních funkcí u Alzheimerovy choroby. In: *Centrum duševního zdraví* [online]. 2010 [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: <http://www.cdzjesenik.cz/Ter.kognit.por.uAlheimera.pdf>

JIRÁK, Roman. SOUČASNÉ TRENDY V KOGNITIVNÍ FARMAKOTERAPII ALZHEIMEROVY CHOROBY. *Neurologie pro praxi: Z pomezí neurologie*. 2002, č. 2, s. 101-105.

JIRÁK, Roman a Kateřina VNOUČKOVÁ. Rivastigminum. *Remedia*. 2003, č. 6, 372–378.

KASSA, J., K. MUSILEK, M. KOOMLOVA a J. BAJGAR. A Comparison of the Efficacy of Newly Developed Reversible Inhibitors of Acetylcholinesterase with Commonly Used Pyridostigmine as Pharmacological Pre-Treatment of Soman-Poisoned Mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2012, č. 110, s. 322-326.

KORABECNY, K. MUSILEK, F. ZEMEK, A. HOROVA, O. HOLAS, E. NEPOVIMOVÁ, V. OPLETALOVA, J. HROUDOVA, Z. FISAR, Y. JUNG a K. KUČA. Synthesis and in vitro evaluation of N-alkyl-7-methoxytacrine hydrochlorides as potential cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010, č. 20, s. 6093-6095.

KORABECNY, J., K. MUSILEK, F. ZEMEK, A. HOROVA, O. HOLAS, E. NEPOVIMOVA, V. OPLETALOVA, J. HROUDOVA, Z. FISAR, Y. JUNG a K. KUČA. Synthesis and in vitro evaluation of 7-methoxy-N-(pent-4-enyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine—new tacrine derivate with cholinergic properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011, č. 21.

KOUKOLÍK, František a Roman JIRÁK. *Alzheimerova nemoc a další demence*. Praha 7: Grada Publishing, spol, s.r.o., 1998. ISBN 80-7169-615-3.

MUSIEK, E.S. a S.E. SCHINDLER. Alzheimer disease: current concepts & future directions. *Missouri Medicine*. 2013, č. 110, s. 395-400.

PATOČKA, Jiří. Látky psychicky zneschopňující. In: *Univerzita obrany* [online]. 2013 [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: http://www.unob.cz/fvz/struktura/k304/Documents/latky_psychicky_zneschopnujici.pdf

PREISS, Marek et al. *Klinická neuropsychologie*. Praha 7: Grada Publishing, spol, s.r.o., 1998. ISBN 80-7169-443-6.

RESEARCH CENTER. *Alz.org: Alzheimer's association* [online]. 2014 [cit. 2014-03-22]. Dostupné z: http://www.alz.org/research/science/alzheimers_disease_causes.asp

RESSNER, Pavel. ALZHEIMEROVA CHOROBA – DIAGNOSTIKA A LÉČBA. *Neurologie pro praxi*. 2004, č. 1.

ROGERS, S.L., M.R. FARLOW, R.S. DOODY, R. MOHS a L.T. FRIEDHOFF. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil Study Group. *Neurology*. 1998, č. 1.

SKOUMALOVÁ, A. Periferní markery oxidačního stresu u Alzheimerovy choroby. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2011, č. 4, 218–222.

ŽĎÁROVÁ KARASOVÁ, J., K. KUČA, D. JUN a J. BAJGAR. UŽITÍ ELLMANOVY METODY PRO STANOVENÍ AKTIVIT CHOLINESTERAS PŘI IN VIVO HODNOCENÍ ÚČINKŮ REAKTIVÁTORŮ. *Chemické listy: Laboratorní přístroje a postupy*. 2010, č. 104, s. 46-50.